

- inn. Med. S. 456 (1963). — 16. HAWKINS, J. D., Immunology 7, 229 (1964). — 17. ALEXANDER H. L., und M. B. JOHNSON und J. H. ALEXANDER, Science (Wash.) 101, 547 (1945). — 18. WEILER, R. J., D. HOFSTRA, A. SZENIVANYI, R. T. BLAISDELL und D. W. TALMAGE, J. Immunology 85, 130 (1960). — 19. FAHEY, J. L. und M. E. LAWRENCE, J. Immunology 91, 597 (1963). — 20. MCKELVEY, E. M. und J. L. FAHEY, J. Clin. Invest. 44, 1778 (1965). — 21. KABAT, E. A. und M. M. MAYER, Experimental Immunochemistry, 2. Aufl. Ch. C. Thomas, Springfield, Ill. (1961). — 22. OUCHTERLONY, Ö., Immunochemie, 15. Colloqu. der Ges. f. physiol. Chemie, Mosbach/Baden 1964, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (1965). — 23. FEINBERG, J. G., Internat. Arch. Allergy 11, 129 (1957).

Dr. Dr. H. E. Müller

34 Göttingen, Kreuzberggring 57

## Fermente des menschlichen Blutes

### XIV. Mitteilung<sup>1)</sup>: Quantitative Verfolgung des Wirkungsverlaufes von Bernsteinsäuredicholinester und Bernsteinsäuremonocholinester auf esterspaltende Enzyme des menschlichen Blutes

Von W. PILZ, A. T. BOO und E. STELZL

Aus dem Physiologisch-chemischen und analytischen Labor (Leiter: Dr. W. Pilz) der Ärztlichen Abteilung  
(Leiter: Dr. H. Hörlein) der Farbenfabriken Bayer AG, Werk Leverkusen

(Eingegangen am 3. September 1966)

Es wurde der Verlauf der Hemmwirkung von Bernsteinsäuredicholinester und Bernsteinsäuremonocholinester auf die Serumesterasen Acetylcholinesterase, Carboxylesterase, die Arylesterasen, die endogene Lipoproteidlipase sowie auf die Acetylcholinesterase menschlicher Erythrocyten quantitativ verfolgt. Es ergaben sich zum Teil stark unterschiedliche Hemmkurven. Die Acetylcholinesterasen in Serum und Erythrocyten zeigen ein ungewöhnliches Bild. Aus der Identität der Kurvenverläufe konnte die große Ähnlichkeit von 3 Acetylcholinesterasetypen erkannt werden. Der stark unterschiedliche Kurvenverlauf für beide Arylesterasen erhärtet den schon früher auf anderem Weg erhobenen Befund, daß es sich dabei um verschiedene Enzyme handelt.

The time course of inhibition by succinic acid dicholine ester and succinic acid monocholine ester was measured quantitatively on the following serum enzymes: acetylcholine esterase, carboxylesterase, arylesterase, endogenous lipoprotein lipase, and on the acetylcholine esterase of human erythrocytes. There were some marked differences in the inhibition-curves. The acetylcholine esterases in serum and erythrocytes give an unusual picture. The identical nature of the curves indicates a strong similarity between the 3 acetylcholine esterase types. The markedly different curves for the two arylesterases strengthens the earlier finding, obtained by different means, that these are separate enzymes.

Wie wir zeigen konnten, wird Bernsteinsäuredicholinester von menschlichem Vollserum nicht hydrolysiert (2). Diese Befunde stehen im Widerspruch zu der Theorie von KALOW, der im menschlichen Vollserum eine deutliche Hydrolysefähigkeit für Bernsteinsäuredicholinester fand. Die bei der Applikation der Verbindung gelegentlich auftretenden verlängerten Apnoen werden auf eine atypische Pseudocholinesterase zurückgeführt, die nach KALOW (3) genetisch determiniert ist (Literatur s. (3)). Eine Reihe von Fakten sprechen gegen diese Theorie. So haben von den insgesamt 104 von KALOW beobachteten Apnoen 35 Fälle einen normalen Enzymspiegel und 4 Fälle eine zwar erniedrigte Enzymaktivität, aber normale Dibucainzahlen; somit konnten 39 Fälle als dem normalen Gentyp zugehörig identifiziert werden (3) (vgl. A. DOENICKE (4)). Nach diesen Resultaten können verlängerte Apnoen nach Succinylbischolin-Applikation nicht mehr ausschließlich auf das Vorhandensein einer genetisch determinierten atypischen Pseudocholinesterase oder einer Mischform zwischen dieser und einem normalen Enzym (intermediäre Esterase) zurückgeführt werden. Die Identifizierung einer atypischen Pseudocholinesterase (Substrat: Benzoylcholin!)<sup>2)</sup> erfolgt z. B.

durch die Bestimmung der Dibucainzahl. Auch Mischformen können so erfaßt werden (3). Wir werden in Kürze beweisen, daß die Bestimmung der Dibucainzahlen (5, 6, 7) zumindest von analytischer Seite her problematisch ist (8).

Nach den Gesetzen der Genetik ist beim heutigen Stand unserer Kenntnisse die Annahme eines stummen Gens („silent gene“) notwendig. Im Arbeitskreis von GOEDDÉ (7) konnte vor kurzem nachgewiesen werden, daß ein Serum, das als Vollserum überhaupt keine enzymatische Aktivität für Acetylcholin und Benzoylcholin aufwies, nach Trennung im Stärkegel deutliche enzymatische Aktivitäten hatte, die von denen eines Normalserums kaum verschieden waren. Somit dürfte die Annahme eines stummen Gens als nicht gesichert gelten (vgl. dazu die Hypothese eines die Serumesterasen hemmenden Proteins, das eine andere elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit als die Enzyme hat (2)).

Die extrem kurze Wirkungsdauer von Succinylbischolin in vivo kann mit einer Hydrolyse des Enzyms durch menschliche Serumesterasen nicht erklärt werden. Dagegen konnten wir vor kurzem an 68 verschiedenen Lungenhomogenaten zeigen, daß in der menschlichen Lunge das Gleichgewicht der Reaktion Succinylbischolin + H<sub>2</sub>O  $\rightleftharpoons$  Succinylmonocholin + Cholin ganz auf der Seite des Succinylmonocholins liegt (10). Die Einstellung des Gleichgewichtes erfolgt unter Verhältnissen, die den Bedingungen in vivo nachgeahmt sind, durch ein noch nicht isoliertes Enzym innerhalb

<sup>1)</sup> Letzte Mitteilung: W. PILZ, Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem. 345, 80 (1966).

<sup>2)</sup> Enzym: E. C. 3.1.1.9 — Dieses Enzym ist nach neuesten Erkenntnissen (1) mit dem Enzym E. C. 3.1.1.8. identisch; es handelt sich um eine Enzymgruppe (11 Einzelfermente), die substratunspezifisch ist.

weniger Minuten. Succinylbischolin wird also in der Lunge mit hoher Geschwindigkeit bis zum Succinylmonocholin hydrolysiert, das seinerseits nur mehr  $\frac{1}{8}$  bis  $\frac{1}{10}$  der pharmakologischen Wirkung des Diesters hat (Kaninchen) (11).

Beim derzeitigen Stand unserer Kenntnisse sind exakte Angaben über den Wirkungsmechanismus des Bernsteinsäuredicholinesters nicht zu machen (3). Eine Möglichkeit, Einblick in den Wirkungsmechanismus zu erhalten, schien uns die quantitative Verfolgung des Wirkungsverlaufes von Bernsteinsäuredicholinester und Bernsteinsäuremonocholinester auf die esterspaltenden Enzyme des menschlichen Blutes. Bereits EVANS und Mitarbeiter (12) konnten zeigen, daß sowohl die Acetylcholinesterase durch menschliches Vollserum als auch die Acetylcholinesterase der Erythrocyten bereits durch geringe Mengen Succinylbischolin gehemmt werden. Genaue Angaben (Maß der Hemmung in Abhängigkeit von der zugesetzten Succinylcholinmenge) wurde nur für die Hydrolyse von Acetylcholin durch menschliches Serum gemacht. Da diese Daten der Ausgangspunkt für eine systematische Bearbeitung der Hemmbarkeit verschiedener Esterasen durch Bernsteinsäurecholinester waren, haben wir die Angaben graphisch dargestellt, um sie mit unseren Ergebnissen vergleichen zu können. Abbildung 1 zeigt die von EVANS und Mitarbeitern (12) erhaltenen Resultate.

Die Hemmbarkeit einer Reihe von Serumenzymen und der Acetylcholinesterase der Erythrocyten interessierte auch deshalb, weil wir in einem Fall von verlängerter Apnoe stark verminderte Enzymwerte für mehrere Esterasen fanden. Dagegen war bei einem Fall von Myotonie nur die Hydrolyse von  $\alpha$ -Naphthylpropionat (Carboxylesterase, E. C. 3.1.1.1.) erniedrigt, während alle anderen Enzyme entweder normal oder deutlich erhöht waren (13). Abgesehen von dem Befund von EVANS und Mitarbeitern war es auch in diesem Zusammenhang von Interesse, ob und wie Bernsteinsäurecholinester die Fermentaktivität esterspaltender Enzyme im menschlichen Serum beeinflussen.

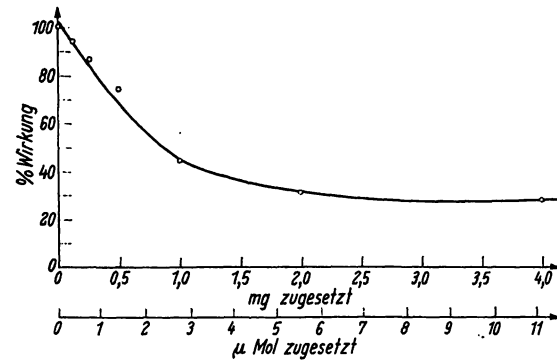


Abb. 1

Wirkung von Bernsteinsäuredicholinester auf die Acetylcholinesterase des menschlichen Serums nach EVANS (12).

Substrat: Acetylcholin; eingesetzte Serummenge: 1 ml; Aktivität ohne Hemmstoff (= 100% Wirkung): 55  $\mu$ l CO<sub>2</sub>/Min.; obere Abszisse: mg Bernsteinsäuredicholinester zugesetzt; untere Abszisse:  $\mu$ Mol Bernsteinsäuredicholinester zugesetzt; Ordinate: % Wirkung

### Methodik

Die Untersuchungen wurden zunächst mit elektrophoretisch reinen Enzymen (Präparative Stärkebreielektrophorese analog (1)) durchgeführt. Wie sich in Vorversuchen herausstellte, bestand dann kein Unterschied in den Resultaten zwischen elektrophoretisch reinen Enzympräparaten und Vollserum, wenn das entsprechende spezifische Substrat vorgelegt und im pH-Optimum des Enzyms gearbeitet wurde. Die mitgeteilten Ergebnisse wurden mit Vollserum als biologisches Material erhalten.

In allen Fällen wurde sichergestellt, daß in dem Bereich, in dem die Analyse durchgeführt wurde, Linearität zwischen eingesetzter Enzymmenge und gespaltenem Substrat (entsprechend der Forderung in (13)) bestand. Die eingesetzte Serummenge wurde in mg Protein-N angegeben (Bestimmung der vorher dialysierten wäbr. Serumverdünnung nach Kjeldahl). Zur Untersuchung der Acetylcholinesterase der Erythrocyten wurde ein wäbr., stromatafreies Hämolyt — durch Zentrifugieren des Hämolytates mit Tetra-chlorkohlenstoff erhalten — verwendet, in dem zusätzlich Hämoglobin als CN-Met-Hb nach (14) bestimmt wurde. Die Enzyme, die verwendeten Substrate, ihr Gehalt an Protein-N und die Bestimmungsmethoden sind in Tabelle 1 zusammengefaßt.

Alle Substrate mit Ausnahme von Tween 60 waren 1,33 mm, Tween 60 war 0,450 mm; das Bebrütungsvolumen betrug in allen Fällen 30 ml; als Puffer wurde ausschließlich TRIS-Essigsäure (25) von entsprechendem pH-Wert verwendet. Die Ergebnisse der Enzymbestimmungen ohne Hemmstoff wurden jeweils gleich 100% gesetzt und die folgenden Werte darauf bezogen (= % Wirkung). Serum wurde von gesunden jungen Versuchspersonen

Tab. 1

Zusammenstellung der Enzyme, auf die die Wirkung der beiden Bernsteinsäurecholinester untersucht wurde, deren Substrate und Methoden zur Aktivitätsbestimmung

Enzyme	Substrat	Protein-N <sup>1)</sup> (mg)	pH <sup>2)</sup>	Bestimmungsmethode
Acetylcholinesterase (Serum)	Acetylcholin	3,0	8,6	als Eisen(III)-Hydroxamat (15) nach der Methode (16)
Carboxylesterase	Benzoylcholin	3,0	8,6	wie Acetylcholin photometrische Bestimmung eines extrahierbaren, aus dem entstandenen $\alpha$ -Naphthol erzeugten Azofarb- stoffes (20)
	$\alpha$ -Naphthylpropionat	1,0	8,6	
Arylesterase	Phenylacetat	0,6	8,0	photometrische Bestimmung eines extrahierbaren, aus dem entstandenen Phenol erzeugten Azofarbstoffes (17) photometrische Bestimmung eines extrahierbaren, aus dem entstandenen $\beta$ -Naphthol erzeugten Azofarb- stoffes (18, 19)
	$\beta$ -Naphthylpropionat	1,0	8,0	
Endogene Lipoproteidli- pase (Clearing-Enzym, CE)	Tween 60	12,4	8,5	a) Messung der durch Calciumstearat hervorgerufenen Trübung (21) b) durch Bestimmung der nicht gespaltenen Stearin- säureester als Eisen(III)-Hydroxamate (22) nach einer allgemein für Ester langkettiger Fettsäuren an- wendbaren Methode (23)
Acetylcholinesterase (Erythrocyten)	Acetylcholin	7,7 <sup>3)</sup>	7,2	als Eisen(III)-Hydroxamat (15) nach (24)

<sup>1)</sup> Je Bestimmung eingesetzt.

<sup>2)</sup> Hb-Gehalt: 14,28 mg.

<sup>3)</sup> Es wurde stets im pH-Optimum der Enzyme gearbeitet.

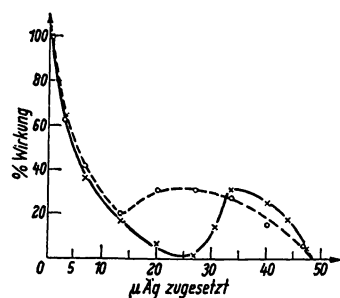


Abb. 2

Wirkung von Bernsteinsäuredicholinester (ausgezogene Linie) und Bernsteinsäuremonocholinester (unterbrochene Linie) auf die Acetylcholinesterase des menschlichen Serums.

Substrat: Acetylcholin; eingesetzte Serummenge: entspr. 3,0 mg Protein-N je Analyse; Aktivität ohne Hemmstoff (= 100% Wirkung): 12,8 µÄq je Std.; Abszisse: µÄq Bernsteinsäureester zugesetzt; Ordinate: % Wirkung

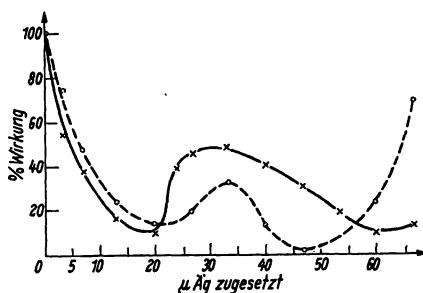


Abb. 3

Wirkung von Bernsteinsäuredicholinester (ausgezogene Linie) und Bernsteinsäuremonocholinester (unterbrochene Linie) auf die Acetylcholinesterase menschlicher Erythrocyten

Substrat: Acetylcholin; eingesetzte Hämolysemenge: entspr. 7,7 mg Protein-N und 12,28 mg Hb je Analyse; Aktivität ohne Hemmstoff (= 100% Wirkung): 16,8 µÄq je Std.; Abszisse: µÄq Bernsteinsäureester zugesetzt; Ordinate: % Wirkung

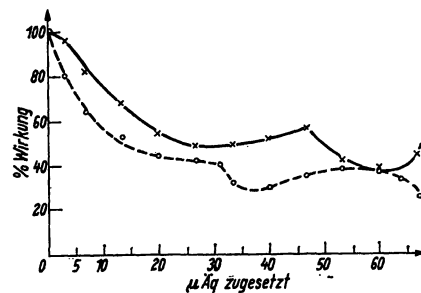


Abb. 4

Wirkung von Bernsteinsäuredicholinester (ausgezogene Linie) und Bernsteinsäuremonocholinester (unterbrochene Linie) auf die Carboxylesterase des menschlichen Serums.

Substrat: Benzoylcholin; eingesetzte Serummenge: entspr. 3,0 mg Protein-N je Analyse; Aktivität ohne Hemmstoff (= 100% Wirkung): 16,3 µÄq je Std.; Abszisse: µÄq Bernsteinsäureester zugesetzt; Ordinate: % Wirkung

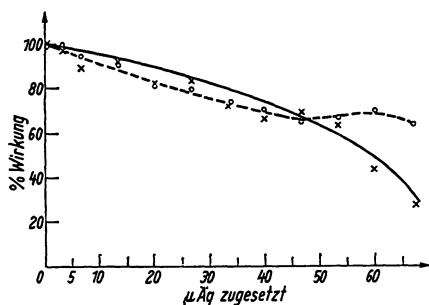


Abb. 5

Wirkung von Bernsteinsäuredicholinester (ausgezogene Linie) und Bernsteinsäuremonocholinester (unterbrochene Linie) auf die Carboxylesterase des menschlichen Serums.

Substrat:  $\alpha$ -Naphthylpropionat; eingesetzte Serummenge: entspr. 1,0 mg Protein-N je Analyse; Aktivität ohne Hemmstoff (= 100% Wirkung): 14,4 µÄq je Std.; Abszisse: µÄq Bernsteinsäureester zugesetzt; Ordinate: % Wirkung

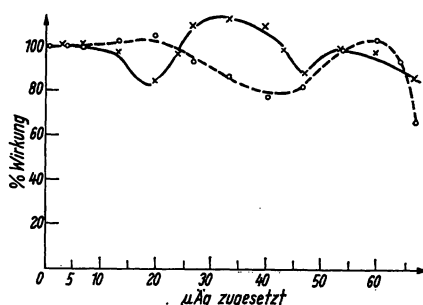


Abb. 6

Wirkung von Bernsteinsäuredicholinester (ausgezogene Linie) und Bernsteinsäuremonocholinester (unterbrochene Linie) auf die Arylesterase des menschlichen Serums.

Substrat: Phenylacetat; eingesetzte Serummenge: entspr. 0,6 mg Protein-N je Analyse; Aktivität ohne Hemmstoff (= 100% Wirkung): 13,8 µÄq je Std.; Abszisse: µÄq Bernsteinsäureester zugesetzt; Ordinate: % Wirkung

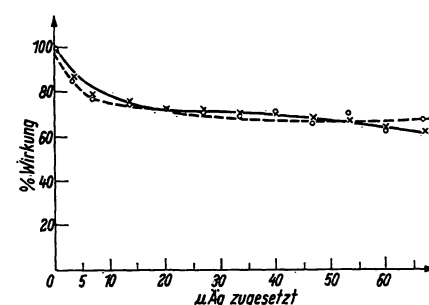


Abb. 7

Wirkung von Bernsteinsäuredicholinester (ausgezogene Linie) und Bernsteinsäuremonocholinester (unterbrochene Linie) auf die Arylesterase des menschlichen Serums.

Substrat:  $\beta$ -Naphthylpropionat; eingesetzte Serummenge: entspr. 1,0 mg Protein-N je Analyse; Aktivität ohne Hemmstoff (= 100% Wirkung): 9,8 µÄq je Std.; Abszisse: µÄq Bernsteinsäureester zugesetzt; Ordinate: % Wirkung

durch Punktion der leicht gestauten *Vena cubitalis*, gerinnen lassen und zentrifugieren gewonnen. Jeder Punkt in den Abbildungen ist das Mittel aus sieben Einzelbestimmungen, die nicht mehr als  $\pm 2\%$  voneinander abweichen durften.

Die Bestimmung der Hemmwirkung wurde wie folgt durchgeführt: Die Hemmstofflösung (Lösungen der beiden Bernsteinsäuredicholinester) wurden mit dem biologischen Material vereinigt und 20 Min. bei Zimmertemperatur stehengelassen; erst dann erfolgt der Zusatz der Substrate. Bei jeder einzelnen Serumverdünnung wurde in einer gleichzeitig angesetzten Analyse festgestellt, ob unter den gegebenen Umständen Bernsteinsäuredicholinester hydrolysiert werden; das war niemals der Fall.

## Ergebnisse

Abbildung 2 zeigt die Wirkung der beiden Bernsteinsäuredicholinester auf die Acetylcholinesterase des menschlichen Serums. Die Hydrolyse von Acetylcholin wird durch Bernsteinsäuredicholinester bis auf Null gehemmt. Durch Erhöhung der Hemmstoffkonzentration wird wieder eine Enzymaktivität erhalten, die dann bei weiterer Konzentrationserhöhung erneut Null wird. Bei Verwendung von Bernsteinsäuremonocholinester liegen die Verhältnisse ähnlich, das erste Aktivitätsminimum wird jedoch früher erreicht.

Die Hemmwirkung auf die Acetylcholinesterase der Erythrocyten verläuft ähnlich. Die Aktivität dieses Enzyms wird jedoch niemals Null, sofern der Bernsteinsäurediester als Hemmstoff verwendet wird (Abb. 3). Ein anderes Bild wird mit dem Bernsteinsäuremonocholinester erhalten. Die Hemmung ist so stark, daß die Enzymaktivität Null wird, um bei größeren Konzentrationen wieder bis gegen 70% der Ausgangsaktivität anzusteigen.

Die Carboxylesterasen des menschlichen Serums werden ebenfalls gehemmt, jedoch ist das Bild nicht mit dem unerwarteten Hemmverlauf der Acetylcholinesterasen vergleichbar. Es besteht eine deutliche Abhängigkeit des Hemmverlaufes vom verwendeten Substrat. Bei der Spaltung von Benzoylcholin fällt auf, daß der Bernsteinsäuremonoester etwas stärker hemmt als der Diester (Abb. 4). Beim Substrat  $\alpha$ -Naphthylpropionat ist das Gegenteil der Fall: der Bernsteinsäurediester hemmt stärker als der Monoester (Abb. 5).

Die Arylesterasen sind vergleichsweise resistent. Aber auch hier ist eine deutliche Abhängigkeit vom Substrat festzustellen. Die Hemmung der Hydrolyse von Phenyl-

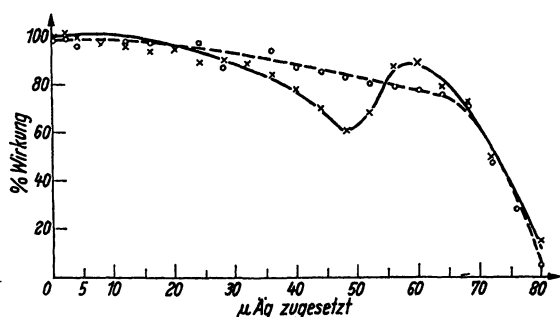


Abb. 8

Wirkung von Bernsteinäuredicholiner (ausgezogene Linie) und Bernsteinäuremonocholiner (unterbrochene Linie) auf die endogene Lipoproteinlipase (Clearing-Enzym) des menschlichen Serums.

Substrat: Tween 60; eingesetzte Serummenge: entsprechend 12,4 mg Protein-N je Analyse; Aktivität ohne Hemmstoff (= 100% Wirkung): 28,6 µÄq je 24 Stdn.; Abszisse: µÄq Bernsteinäureester zugesetzt; Ordinate: % Wirkung

acetat (Abb. 6) ergibt einen weitgehend anderen Verlauf, als die Hemmung der Hydrolyse von  $\beta$ -Naphthylpropionat (Abb. 7).

Das Clearing-Enzym wird von niedrigen Konzentrationen an Bernsteinäurecholinestern wenig beeinflusst, während bei höheren Konzentrationen starke Hemmung eintritt. Dabei fällt besonders auf, daß der Hemmverlauf mit Bernsteinäuredicholiner eine Feinstruktur zeigt: zunächst tritt eine Hemmung auf etwa 60% ein, bei Erhöhung der DisuccinylcholinKonzentration erfolgt eine Erholung der Enzymaktivität bis gegen 90%, um bei noch höheren Konzentrationen ganz abzufallen. Diese Feinstruktur fehlt in der Hemmkurve für das Clearing-Enzym, wenn Monosuccinylcholin als Hemmstoff verwendet wird (Abb. 8).

## Diskussion

Der unterschiedliche Hemmverlauf bei den Carboxylesterasen kann aus der komplexen Zusammensetzung dieser Enzyme verstanden werden. So ist bei den 11 verschiedenen Carboxylesterasen (1) die Fermentaktivität für Benzoylcholin und  $\alpha$ -Naphthylester jeweils verschieden. Im Falle des  $\alpha$ -Naphthylpropionates und Disuccinylcholins stellt die Kurve den Anfangsteil einer von uns bereits früher gefundenen Beziehung (2) dar. Die unterschiedliche Hemmbarkeit der Arylesterasen ist verständlich, wenn man bedenkt, daß Phenylacetat und  $\beta$ -Naphthylpropionat sicherlich nicht von dem gleichen

Enzym hydrolysiert werden (26) (vgl. auch (2)). — Der Hemmverlauf für die Acetylcholinesterase des Serums mit Bernsteinäurecholinester regt zu mancherlei Überlegungen an. Es muß in diesem Zusammenhang erwähnt werden, daß auch menschliches Lungengewebe eine spezifische Acetylcholinesterase enthält; stellt man die beiden Enzyme auf gleichen Protein-N-Wert ein, ergeben sie mit Bernsteinäuredicholiner nahezu identische Hemmkurven (10). Ähnliches gilt für die Acetylcholinesterase der Erythrocyten. Eine endgültige Deutung dieser Befunde kann beim derzeitigen Stand unserer Kenntnisse über die physiologische Funktion des Acetylcholins und der Acetylcholinesterasen noch nicht gegeben werden. Die Ergebnisse stimmen gut mit den Befunden von EVANS und Mitarbeitern (12) überein (Abb. 1). Auch das Verhalten des Clearing-Enzyms gegen die beiden Bernsteinäureester kann noch nicht gedeutet werden. Eine Untersuchung von 12 Sera von Graviden zeigte zwar eine niedrige Enzymaktivität, der Verlauf der Hemmkurven für die beiden Bernsteinäureester (bei unserer Art der Berechnung fällt die Absoluthöhe der Enzymaktivität heraus!) war jedoch mit den bei Normalpersonen gefundenen Kurven identisch.

Insgesamt konnte gezeigt werden, daß alle bisher definierten Serumhydrolasen durch die beiden Bernsteinäurecholinester gehemmt werden. Der Grad der Hemmung und vor allem der Verlauf der Hemmkurven ist für die einzelnen Enzyme unterschiedlich und wahrscheinlich charakteristisch. Als praktische Resultate des vorliegenden Verfahrens sind besonders die Verschiedenheit der beiden Arylesterasentypen, die schon früher auf anderem Weg gesichert werden konnte (26), sowie starke Ähnlichkeit der Acetylcholinesterasen aus Lungengewebe (10), den Erythrocyten (28) und des Serums (1, 10) zu erwähnen. Da außerdem die elektrophoretisch reinen analog (1) gewonnenen Enzyme dieselben Kurvenbilder liefern wie das Vollserum, sofern man das spezifische Substrat vorlegt, halten wir den Kurvenverlauf als für die entsprechenden Fermente charakteristisch.

Wir werden in Kürze weiteres Material vorlegen, das nach der hier beschriebenen Methode erhalten wurde, in dem die Wirkung von biologisch aktivem Material — z. B. reine Enzymproteine — und von Zwischenprodukten, insbesondere des Kohlehydratstoffwechsels, auf Serumenzyme beschrieben wird.

## Literatur

1. PILZ, W., Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 345, 80 (1966).
2. PILZ, W. und H. HÖRLEIN, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 339, 157 (1964).
3. KALOW, W., Anaesthesist 15, 13 (1966).
4. DOENICKE, A., Dtsch. med. Wschr., im Druck (1967).
5. KALOW, W., Anesthesiology 25, 377 (1964).
6. KALOW, W. und K. GENEST, Canad. J. Biochem. Physiol. 35, 339 (1957).
7. GOEDDE, H. W., D. GEHRING und R. HOFMANN, Z. analyt. Chem. 212, 238 (1965).
8. PILZ, W., A. T. BOO und I. JOHANN, in Vorbereitung.
9. GEHRING, D., H. W. GOEDDE und R. HOFMANN, Vortrag; Herbsttagung Ges. Physiol. Chem., Berlin, Oktober (1965).
10. PILZ, W., Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem., im Druck.
11. PILZ, W. und G. KIMMERLE, in Vorbereitung.
12. EVANS, F. T., P. W. S. GRAY, A. LEHMANN und E. SILK, Lancet 262, 1229 (1952).
13. PILZ, W., diese Z. 3, 89 (1965).
14. PILZ, W., I. JOHANN und E. STELZL, Z. analyt. Chem. 215, 260 (1966).
15. PILZ, W., Z. analyt. Chem. 162, 81 (1958).
16. PILZ, W., Zschr. exper. Med. 132, 310 (1959).
17. PILZ, W. und I. JOHANN, Z. analyt. Chem. 212, 410 (1965).
18. PILZ, W., Mikrochim. Acta (Wien), 164 (1961).
19. PILZ, W., Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 328, 1 (1962).
20. PILZ, W. und I. JOHANN, Z. analyt. Chem. 210, 113 (1965).
21. HÖRLEIN, H. und W. PILZ, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 327, 256 (1962).

22. PILZ, W., Z. analyt. Chem. 193, 338 (1963). — 23. PILZ, W. und I. JOHANN, Z. analyt. Chem. 218, 426 (1966). — 24. PILZ, W., I. JOHANN und E. STELZL, Klin. Wschr. 43, 1227 (1965). — 25. PILZ, W. und I. JOHANN, Z. analyt. Chem. 215, 105 (1965). —

26. PILZ, W., Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 328, 247 (1962). — 27. PILZ, W. und H. HÖRLEIN, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 330, 212 (1963). — 28. PILZ, W. und E. STELZL in Vorbereitung.

Dr. W. Pilz

Physiol.-chem. u. analyt. Labor der ärztl. Abt.

509 Leverkusen-Bayerwerk

## Chlorid-Bestimmungen in nativem Humanserum mit Filter-Flammenphotometern

VON G. BECHTLER, B. GUTSCHE, R. HERRMANN, W. LANG und D. STAMM<sup>1)</sup>

*Aus der Anwendungstechnischen Abteilung der Firma Eppendorf Gerätebau, Hamburg, der Abteilung für Medizinische Physik an der Universitäts-Hautklinik Gießen und der Abteilung für Klinische Chemie des Max-Planck-Institutes für Psychiatrie, München*

(Eingegangen am 20. Januar 1967)

Es werden zwei nur wenig verschiedene Methoden zur Serum-Chlorid-Bestimmung in nativem Humanserum angegeben, die für zwei verschiedene, handelsübliche Typen von Filterflammenphotometern ausgearbeitet wurden. Damit kann man mit solchen einfachen Geräten nicht nur Natrium, Kalium und Calcium, sondern zusätzlich auch noch Chlor bestimmen. Es wird gezeigt, daß die Genauigkeit und Richtigkeit der Methode ausgezeichnet ist, gleichgültig, welche der beiden Methoden und welches der beiden Geräte man verwendet.

Two methods are given for the measurement of chloride in native human serum; they differ only slightly, depending on which of two commercial filter-flame photometers is used. Thus, with these simple apparatuses, not only sodium, potassium and calcium, but also chlorine can be measured. The accuracy and precision of the method are very good, and are the same for both methods and both machines.

In zwei vorangegangenen Arbeiten (1, 2) war gezeigt worden, daß man mit Hilfe von Flammen-Spektralphotometern den Chlorid-Gehalt in nativem Humanserum mit außerordentlich geringer Streubreite (Synonyma: Präzision, Reproduzierbarkeit; charakterisiert durch die Standardabweichung) bestimmen kann. Die erzielbaren Genauigkeiten dieser indirekten Methode übertreffen sogar die der üblichen direkten flammenphotometrischen Methode. Außerdem war gezeigt worden, daß die vorgeschlagene Methode auch mit sehr guter Richtigkeit arbeitet.

Für die Durchführung dieser früheren Untersuchungen wurde ein aus handelsüblichen Bauteilen zusammengestelltes Flammenphotometer verwendet, bei dem die interessierende Strahlung mit einem *Monochromator* aus dem Spektrum der Flamme ausgesondert wurde. Üblicherweise werden jedoch für flammenphotometrische Analysen im klinischen Labor Flammenphotometer mit *Filtern* — an Stelle eines Monochromators — ausgerüstet. In der vorliegenden Arbeit soll daher gezeigt werden, daß auch mit handelsüblichen Filter-Flammenphotometern (unter Umständen nach Austausch einiger Bauteile) Serum-Chlorid-Analysen möglich sind, sofern man die Methode auf das jeweilige Gerät richtig anpaßt. Die Untersuchungen erfolgten mit dem Flammenphotometer der Fa. Eppendorf Gerätebau, und mit dem Filterflammenphotometer PF 5 der Fa. Carl Zeiss, Oberkochen. Es soll im folgenden über beide methodische Entwicklungen berichtet werden; die Vor- und Nachteile beider Methoden werden einander gegenübergestellt.

### Apparative Einrichtungen

*Flammenphotometer Eppendorf* in der standardmäßigen Ausführung. Zusätzlich werden der Brenner für Wasserstoff/Acetylen, das Flaschenventil für Wasserstoff mit Druckminderer und Zuleitungsschlauch sowie ein Filter zur Silberbestimmung (Schott, UV-Depil 338 m $\mu$ ) benötigt. Das in diesem Fall verwendete Filter hatte nach zusätzlicher Verkittung mit 3 mm UG 3 eine Maximaldurchlässigkeit von 28,8% bei 337 m $\mu$ , seine Halbwertsbreite betrug  $\pm 5,7$  m $\mu$  und die Zehntel-Wertsbreite  $\pm 10,7$  m $\mu$ . Das Silberfilter wird in eine der Leerstellen der Filtertrommel eingesetzt, der Propan/Acetylen-Brenner gegen den Wasserstoff/Acetylen-Brenner ausgetauscht, wobei zusätzlich die Düse 0,5 mm  $\varnothing$  aus der Brenngasleitung vor dem Brenner ausgeschraubt werden muß (3). Die Propanzuleitung wird am Gerät abgeschraubt und durch die Wasserstoffleitung ersetzt. Sollen außerdem Na, K und Ca bestimmt werden, so wird das Gerät für die beiden Alkalimetalle mit Wasserstoff, für das Erdalkalielelement mit Acetylen als Brenngas betrieben.

*Gerät PF 5* der Fa. Carl Zeiss, Oberkochen. Falls ungenügende UV-Empfindlichkeit bei 338 m $\mu$  vorhanden sein sollte, empfiehlt sich folgendes:

Strahlungsempfänger 1 P 22 ersetzen durch 1 P 28, beide von der Fa. „Radio-Corporation of America“ erhältlich. Wenn man ausgesuchte Exemplare von 1 P 22 verwendet, ist dieser Austausch nicht erforderlich. Wenn man solche Exemplare von 1 P 28 verwendet, die auch im langwelligen Bereich noch genügend Empfindlichkeit haben<sup>2)</sup>, kann man den gleichen 1 P 28 für Na-, K-, Ca- und Cl-Analysen verwenden. Das gleiche gilt naturgemäß auch für entsprechend ausgesuchte Exemplare von 1 P 22.

Glaskondensor ersetzen durch einen besser UV-durchlässigen Kondensor<sup>3)</sup>. Wenn man gut ausgesuchte 1 P 28 bzw. 1 P 22

<sup>1)</sup> Die methodischen Untersuchungen der Abteilung für Medizinische Physik in Gießen wurden mit Mitteln der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt.

<sup>2)</sup> z. B. 2 CA 128a oder HTV 213.

<sup>3)</sup> Der Fa. Carl Zeiss, Oberkochen, danken wir für die freundliche Überlassung eines Quarzkondensors.